

Introducing height to mechanobiology

Citation for published version (APA):

Zonderland, J. (2020). *Introducing height to mechanobiology: A tissue engineering perspective*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Gildeprint Drukkerijen. <https://doi.org/10.26481/dis.20200701jz>

Document status and date:

Published: 01/01/2020

DOI:

[10.26481/dis.20200701jz](https://doi.org/10.26481/dis.20200701jz)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Most tissues in the human body have a remarkable ability to regenerate. However, when damage is severe and large sections of any tissue in our body are missing, regeneration is limited. The field of tissue engineering attempts to create scaffolds to fill up this empty space and instruct cells to create new functional tissue. The properties of these scaffolds, such as the material, stiffness, architecture, topography and capacity to present specific proteins, among others, all greatly influence cell behavior. Therefore, to effectively create new tissues, a thorough understanding of how these scaffold properties influence cell behavior is crucial. In this thesis, the focus has been put on bone-marrow derived human mesenchymal stromal cells (hMSCs), which can differentiate to bone, cartilage and fat tissue. This differentiation is highly dependent on mechanobiology, the process of translating mechanical stimuli, such as those from scaffold properties, to biological signals. While mechanobiology is relatively well studied in standard 2D culture platforms, increasing evidence shows that the role and regulation of these proteins is very different in 3D. Understanding how these proteins influence hMSC behavior in 3D is critical, as any tissue engineering approach will expose cells to a 3D environment. In chapter 2 of this thesis, the current literature about mechanobiology in 3D is summarized. Most of the available literature about 3D mechanobiology has been researched in hydrogels. While this has led to valuable insights, most tissue engineering approaches use different kinds of scaffolds made from stiffer materials. In chapter 3, we have looked at how important mechanobiological proteins are regulated differently in 3D scaffolds made from stiff materials. Specifically, we've found that actin-myosin, zyxin, lamin A/C and YAP all exhibit lower expression or activation in 3D than in 2D, on the same materials. Interestingly, while this lower expression profile predicts adipogenic differentiation in 2D, in 3D we obtained efficient osteogenic differentiation, highlighting the difference in the roles of these proteins in 3D. In chapter 4 and 5, we followed up on this research by investigating the role of mechanobiology in cell survival and proliferation in 3D. In chapter 4, we found that the low expression of actin-myosin and zyxin found in chapter 3 greatly influenced the secretion of STC1, an important cell survival protein. Chapter 5 describes how the 3D environment of electrospun (ESP) scaffolds reduce the expression of an important receptor for proliferation, FGFR1, again through actin-myosin. Together, chapter 3-5 build fundamental knowledge about how the 3D environment of common tissue engineering scaffolds influences cell behavior through mechanobiology.

In chapter 6, we have optimized an ESP scaffold to allow for robust cell infiltration. The current 3D migration research has been done mostly in hydrogels. The fibrous scaffold developed in chapter 6, made from stiff materials, can be used to advance fundamental research on 3D migration. In addition, these scaffolds could be used for tissue engineering applications, as it allowed deep cell infiltration and tissue formation *in vivo*. To aid both the fundamental research and the tissue engineering applications in ESP scaffolds, in chapter 7

we developed several methods to include gradients in ESP scaffolds. These gradients could be used to guide and investigate 3D cell migration. Lastly, chapter 8 describes the hydrocup, a hollow ESP scaffold that is used to deliver cell-laden hydrogels *in vivo*. The hydrocup gives extra mechanical support to the hydrogels and partly shields it from the surrounding tissue. It can be used to investigate how environmental properties of the hydrogel affect the hMSC secretome and its effects *in vivo*.

In conclusion, this thesis adds fundamental knowledge to the understanding of cell behavior in 3D and has developed new scaffolds to further study 3D cell- migration and activity. In addition, different scaffolds are developed that could be used for regenerative medicine approaches. Together, the data in this thesis can be a steppingstone for new fundamental research and aid the smarter design of tissue engineering constructs.

Samenvatting

De meeste weefsels in het menselijk lichaam kunnen heel goed regenereren. Wanneer er echter grote stukken weefsel beschadigd zijn, is het herstel gelimiteerd. In het veld van “tissue engineering” wordt geprobeerd om scaffolds te maken die het beschadigde weefsel kunnen vervangen. Deze scaffolds moeten cellen instrueren om nieuw weefsel aan te maken. De eigenschappen van de scaffolds, zoals het materiaal, de stijfheid, de architectuur, de topografie en de mogelijkheid om specifieke eiwitten te presenteren, hebben allemaal grote invloed op het gedrag van de cellen die ermee in aanraking komen. Het is daarom van essentieel belang om goed te begrijpen hoe cellen reageren op de verschillende eigenschappen van de scaffolds. In deze thesis ligt de focus op uit beenmerg geïsoleerde menselijke mesenchymale stromacellen (MSCs), die kunnen differentiëren tot bot-, kraakbeen- of vetweefsel. Deze differentiatie wordt sterk beïnvloed door mechanobiologie, het proces dat mechanische stimuli, zoals de eigenschappen van de scaffolds, vertaalt naar biologische signalen. De mechanobiologie is relatief goed bestudeerd in standaard 2D kweekschalen, maar er komt steeds meer bewijs dat de regulatie en rol van deze eiwitten anders is in 3D kweken. Het is cruciaal om te begrijpen hoe deze eiwitten MSCs beïnvloeden in 3D, omdat cellen in scaffolds uiteindelijk altijd in een 3D omgeving terecht komen. In hoofdstuk 2 van deze thesis is de huidige literatuur over mechanobiologie in 3D samengevat. De meeste literatuur over 3D mechanobiologie is onderzocht in hydrogels. Dit heeft tot waardevolle inzichten geleid, maar de meest gebruikte tissue engineering scaffolds zijn gemaakt van stijvere materialen. In hoofdstuk 3 hebben we gekeken naar hoe belangrijke mechanobiologische eiwitten gereguleerd zijn in deze van stijve materialen gemaakte 3D scaffolds. We hebben gevonden dat actine-myosine, zyxin, lamin A/C en YAP allemaal minder tot expressie komen of geactiveerd worden in 3D kweken dan in 2D kweken van dezelfde materialen. Terwijl dit lagere expressie profiel een differentiatie naar vet zou voorspellen in 2D, differentieerde de MSCs in 3D nog efficiënt naar bot. Dit geeft de verschillende rollen van deze eiwitten weer in 3D ten opzichte van 2D. In hoofdstuk 4 en 5 zijn we verder gegaan op dit onderzoek en hebben we de rol van mechanobiologie onderzocht in de overleving en proliferatie van MSCs in 3D. In hoofdstuk 4 hebben we gevonden dat de secretie van STC1, een belangrijk eiwit voor overleving van cellen, sterk omhooggaat in 3D door de lage expressie van actine-myosine en zyxin die we in hoofdstuk 3 gevonden hebben. In hoofdstuk 5 wordt beschreven hoe de 3D omgeving van scaffolds gemaakt met electrospinning (ESP scaffolds) de expressie verlaagt van een belangrijke proliferatie receptor, FGFR1, wederom door actine-myosine. Samen voegen hoofdstuk 3-5 fundamentele kennis toe aan hoe mechanobiologie het gedrag van cellen beïnvloedt in de 3D omgeving van veel gebruikte tissue engineering scaffolds.

In hoofdstuk 6 hebben we ESP scaffolds ontwikkeld waar cellen diep in kunnen infiltreren. Het huidige onderzoek naar 3D migratie is vooral gedaan in hydrogels. De ESP scaffold van

hoofdstuk 6 is gemaakt van stijve materialen en kan gebruikt worden om fundamenteel onderzoek te doen naar 3D migratie. We hebben ook laten zien dat na implantatie *in vivo*, cellen diep kunnen infiltreren en nieuw weefsel kunnen vormen in deze scaffolds, waardoor deze scaffolds ook gebruikt kunnen worden voor tissue engineering applicaties. Om zowel fundamenteel onderzoek als tissue engineering te ondersteunen hebben we in hoofdstuk 7 meerdere methodes ontwikkeld om gradiënten te maken in ESP scaffolds. Deze gradiënten kunnen gebruikt worden om cellen in een richting te sturen en 3D migratie te onderzoeken. In hoofdstuk 8 hebben we de hydrocup ontwikkeld, een holle ESP scaffold die gebruikt kan worden om hydrogels te implanteren. De hydrocup geeft extra mechanische weerstand aan de zachte hydrogels en beschermt ze gedeeltelijk van het omringende weefsel. Het kan gebruikt worden om het effect van hydrogel-eigenschappen op het MSC secretome *in vivo* te onderzoeken.

Deze thesis voegt fundamentele kennis toe aan hoe het gedrag van cellen wordt beïnvloed in 3D. Daarnaast hebben we scaffolds ontwikkeld die zowel gebruikt kunnen worden om 3D cel-migratie en activiteit te onderzoeken, als voor tissue engineering applicaties. Samen kan de data in deze thesis een basis zijn voor nieuw fundamenteel onderzoek en kan het helpen om slimme tissue engineering scaffolds te ontwikkelen.